



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08101163 A**(43) Date of publication of application: **16 . 04 . 96**

(51) Int. Cl.

**G01N 27/447**  
**B01D 57/02**  
**G01N 30/08**  
**// C12N 13/00**

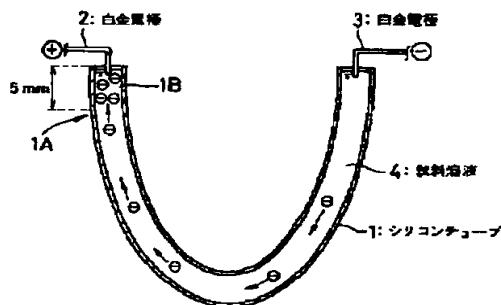
(21) Application number: **06235175**(22) Date of filing: **29 . 09 . 94**(71) Applicant: **TSUDA TAKAO U B I I KAGAKU  
BUNSEKI CENTER:KK**(72) Inventor: **TSUDA TAKAO  
MATSUMOTO TAKATOSHI  
KITAGAWA SHINYA**(54) **METHOD AND DEVICE FOR CONCENTRATION  
OF LIQUID SAMPLE**

## (57) Abstract:

**PURPOSE:** To concentrate an object substance to a high concentration effectively by moving one of the electrodes where no concentration of the solute takes place toward the other electrode continuously or intermittently.

**CONSTITUTION:** Electrodes 2, 3 are inserted to the two ends of a thin tube 1 made of silicone, etc., and one is used as negative electrode while the other as positive electrode. To concentrate the object substance, for example bearing minus electric charges, the silicone tube 1 is filled with a specimen solution 4 containing the object substance, and a DC voltage is impressed on the electrodes 2, 3. The anode electrode 2 on the concentration side is fixed, toward which the cathode side electrode 3 on the counter-concentration side is moved continuously or intermittently. Thereby, the substance is moved to near the anode side electrode 2 and concentrated to a high concentration.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-101163

(43) 公開日 平成8年(1996)4月16日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 27/447

B 0 1 D 57/02

G 0 1 N 30/08

L

G 0 1 N 27/ 26

3 3 1 Z

3 3 1 C

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-235175

(22) 出願日 平成6年(1994)9月29日

(71) 出願人 000215073

津田 孝雄

愛知県日進市香久山2-3102

(71) 出願人 594161998

株式会社ユービーイー科学分析センター

東京都品川区東品川2-3-11 UBEビル

(72) 発明者 津田 孝雄

愛知県愛知郡日進町香久山2-3102

(72) 発明者 松本 隆利

愛知県名古屋市千種区本山町2-18-3

(72) 発明者 北川 慎也

富山県中新川郡上市町上経田3-71

(74) 代理人 弁理士 重野 剛

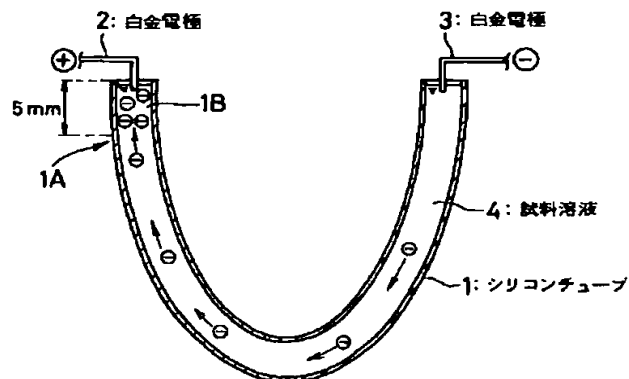
(54) 【発明の名称】 液体試料の濃縮方法及び液体試料の濃縮装置

(57) 【要約】

【目的】 電場濃縮法により、目的物質を高濃度に濃縮する。

【構成】 目的物質の濃縮が起こらない側の電極を、濃縮側電極に向けて移動させる液体試料の濃縮方法。陽極及び陰極の少なくとも一方が他方に向けて接近方向に移動可能である液体試料の濃縮装置。

【効果】 目的物質が最低限界濃度以上である領域に反濃縮側電極を濃縮側電極に向けて移動させると、濃縮側電極では効果的に目的物質の濃縮が進行し、目的物質が高濃度に濃縮された試料を得ることができる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 電荷を有する溶質を含有する液体試料を陽極及び陰極を備える容器内に收容し、該陽極及び陰極に対し直流電圧を印加して、前記溶質を該陽極及び陰極のいずれか一方の電極に向けて電気泳動させることにより該溶質の濃縮を行う方法において、溶質の濃縮が起こらない他方の電極を、連続的又は断続的に該一方の電極に向けて移動させることを特徴とする液体試料の濃縮方法。

【請求項2】 液体試料を收容するための容器と、該容器内に配置された陽極及び陰極と、該陽極及び陰極に対し直流電圧を印加する電源とを備えてなり、該陽極及び陰極の少なくとも一方が他方に向って接近方向に移動可能である液体試料の濃縮装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は液体試料の濃縮方法及び液体試料の濃縮装置に係り、特に、電荷を有する溶質を目的物質として含有する液体試料を陽極及び陰極を備える容器内に收容し、該陽極及び陰極に対し直流電圧を印加して、前記溶質を該陽極及び陰極のいずれか一方に向けて電気泳動させることにより、該溶質の濃縮を行う方法（以下「電場濃縮法」と称す。）において、目的物質を高濃度に濃縮することができる濃縮方法及びそのための濃縮装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】希薄な物質の分析を行う際には、これを予め濃縮することが必要となる。この場合の濃縮手段として、電場を利用した濃縮法があり、具体的には、電着、電気透析、等速電気泳動、電気クロマトグラフィ一、向流電気濃縮などの方法が公知である。

【0003】また、電場濃縮法、即ち、細管中に試料溶液を満たし細管の両端間に電圧を印加し、溶質の電気移動度により、電気泳動的に濃縮を行う方法も知られている。この方法では、例えば濃縮目的物質が陰イオンであれば、経時的に目的物質は陽極付近に濃縮される。逆に、陰極付近の目的物質濃度は低くなる。電場濃縮法によれば、比較的小さな電場（40～60V/cm）を用い、例えば40μlという微小体積中の微少試料を簡易に濃縮することができる。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】電場濃縮法では、上述の如く、時間の経過につれて目的物質が一方の電極（以下、「濃縮側電極」と称する場合がある。）付近に濃縮され、他方の電極（以下「反濃縮側電極」と称する場合がある。）付近の目的物質の濃度は低下するが、該反濃縮側電極付近の目的物質濃度が低くなり効率よく捕集するには難しい濃度（以下、「最低限界濃度」と称する場合がある。）に達すると、当該濃度よりも目的物質濃度の低下は起きにくい。換言すると、濃縮側電極において

は、目的物質の濃縮効率が時間とともに低下してゆくので濃縮としては有効に働かない。

【0005】本発明は上記従来の電場濃縮法の問題点を解決し、電場濃縮法により、目的物質を高濃度に効率よく濃縮することができる濃縮方法及びそのための濃縮装置を提供することを目的とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】請求項1の液体試料の濃縮方法は、電荷を有する溶質を含有する液体試料を陽極及び陰極を備える容器内に收容し、該陽極及び陰極に対し直流電圧を印加して、前記溶質を該陽極及び陰極のいずれか一方の電極に向けて電気泳動させることにより該溶質の濃縮を行う方法において、溶質の濃縮が起こらない他方の電極を、連続的又は断続的に該一方の電極に向けて移動させることを特徴とする。

【0007】請求項2の液体試料の濃縮装置は、液体試料を收容するための容器と、該容器内に配置された陽極及び陰極と、該陽極及び陰極に対し直流電圧を印加する電源とを備えてなり、該陽極及び陰極の少なくとも一方が他方に向って接近方向に移動可能であることを特徴とする。

【0008】以下、図面を参照して本発明を詳細に説明する。

【0009】図1、2は本発明の濃縮方法の実施に好適な濃縮装置の実施例を示す断面図である。

【0010】図1に示す濃縮装置は、シリコンチューブ1等の細管の両端に電極2、3を差し込み、一方を陽極、他方を陰極としたものである。

【0011】この装置で、例えばマイナス電荷を有する目的物質を濃縮する場合には、この目的物質を含有する試料溶液4をシリコンチューブ1内に充填し、電極2、3に直流電圧を印加する。そして、濃縮側電極である陽極側電極2を固定し、連続的又は断続的に反濃縮側電極の陰極側電極3を陽極側電極2に向けて移動させる。これにより目的物質は、図1に示す如く、陽極側電極2の近傍に移動し、高濃度に濃縮される。

【0012】逆に、プラス電荷を有する目的物質を濃縮する場合には、濃縮側電極となる陰極側電極3は固定し、反濃縮側電極となる陽極側電極2を連続的又は断続的に陰極側電極3に向けて移動させる。これにより、目的物質は、陰極側電極3の近傍に移動し、高濃度に濃縮される。

【0013】この図1に示す装置は、比較的小容量の試料溶液中の目的物質の濃縮に好適であり、例えば、直径0.5～2.0mm、長さ20～100mm、内容量4～300μlのチューブを用いて簡易な構成で効率的な濃縮を行える。

【0014】図2に示す濃縮装置は、試料溶液4の容器5と、この容器5内の上記開口部付近に設けられた固定電極6と、容器5内の底面近傍から固定電極6へ向けて

10

20

30

40

50

移動可能な移動電極7とを備え、固定電極6を直流電源のプラス（又はマイナス）に、移動電極7をマイナス（又はプラス）に各々接続するようにしたものである。

【0015】この装置において、移動電極7は、試料溶液4内を上昇する際の液抵抗を小さくするために、編み目構造等の液透過性のものとするのが好ましく、図示の如く、平板状の二次元編み目構造や、断面V字形状等の三次元編み目構造等を採用するのが好ましい。

【0016】なお、この移動電極の移動用治具を兼ねるリード線8は絶縁材料で被覆するなどして絶縁構造とする。

【0017】図2に示す構造は、比較的容量の多い試料溶液中の目的物質の濃縮に好適であり、濃縮側電極となる側を固定電極6とし、反濃縮側電極となる側を移動電極7として、固定電極6側に目的物質を高濃度に濃縮することができる。

【0018】なお、固定電極と移動電極との位置関係には何ら制限はなく、容器底部に設けた固定電極に対して、上方から移動電極を下降させて近づけて行くものであってもよい。また、固定電極及び移動電極を水平方向に對向して設け、固定電極に対して、水平方向に移動させて移動電極を近づける構成とすることもできる。また、水平及び垂直方向への同時移動や、三次元的な移動を行うこともできる。

【0019】ところで、濃縮中に濃縮側電極に向けて移動させる反濃縮側電極の移動方法は目的物質の移動速度や濃縮効率に応じて適宜決定され、一定の速度で連続的に移動させても良く、また、所定の間隔で段階的に移動させても良い。

【0020】移動距離は、最も効率的には、目的物質の最低濃度限界領域と反濃縮側電極を重ね合せて連続的に移動させることが望ましいが、技術的にこのような移動を実現することは困難である。

【0021】従って、通常の場合、移動前の電極間距離に対して、 $1/2 \sim 1/10$ の電極間距離となるように、段階的に移動を行うのが好適である。

【0022】なお、印加電圧を変えずに、反濃縮側電極を濃縮側電極に近づけて、電極間距離を小さくした場合、電位勾配は大きくなるが、電位勾配の増大により、一般には濃縮効率がより一層高められるため、印加電圧は変えずに電極の移動を行うのが好ましい。しかし、電気勾配の増大が目的物質に好ましくない場合には、適宜、印加電圧を下げ、電位勾配を一定に保つようにするのが好ましい。

【0023】本発明において、印加電圧等の濃縮条件は、目的物質の電荷や装置の規模、要求される濃縮効率によっても異なるが、通常の場合、印加電圧50～1000V、電位勾配10～20V/cm、で1～10分程度実施される。

【0024】このような本発明の濃縮方法で濃縮する目

的物質としては、後掲の実施例で例示するピロロキノリンキノン、ピリドキサミン二塩酸塩のような電荷を有する物質の他、無電荷の物質を、電荷を有する物質で物理的に結合した複合物質などが挙げられる。この複合物質としては、例えば無電荷物質を陽イオン又は陰イオン界面活性剤で処理したミセルなどが挙げられる。このミセルは当然プラスの電荷を有している。従って、電場濃縮法を適用することが可能となる。

【0025】なお、目的物質は、いずれもその電荷を安定に保つことができる溶液中に溶解ないし分散させることが重要であり、そのために、電場濃縮に供する試料溶液には、当該目的物質の電荷安定化に好適なpH調整剤等を必要に応じて添加する。

【0026】

【作用】目的物質が最低限界濃度以上である領域に反濃縮側電極を濃縮側電極に向けて移動させると、当該領域内で反濃縮側電極周辺の目的物質濃度の低下が起こり、従って、濃縮側電極では、更に目的物質の濃縮が進行し、目的物質が高濃度に濃縮された試料を得ることができる。

【0027】

【実施例】以下に、ピロロキノリンキノン及びピリドキサミン(Pyridoxamine: PM) 二塩酸塩の濃縮を行った実施例及び比較例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り、以下の実施例に限定されるものではない。

【0028】なお、説明の便宜上、いずれの場合も、まず比較例を挙げる。

【0029】I ピロロキノリンキノンの濃縮

比較例1

図1に示す装置を用いて、下記試料溶液の濃縮を行った。図1に示す装置は、シリコンチューブ（直径1.0mm、長さ50mm、内容量約40 $\mu$ l）1をU字型に曲げ、両端に白金電極2、3を取り付け、一方の電極を高圧電源装置のプラス電源に、他方の電極をそのマイナス電源に接続したものである。4は試料溶液を示す。

【0030】試料溶液

濃縮目的物として菌類由来の酸化還元補酵素であるピロロキノリンキノン(Pyrrroloquinoline Quinone: PQQ)を含む、15 $\mu$ M PQQの10体積%ピリジン水溶液。PQQは負の電荷を帯びているので図1に示す如く、陽極2に向かい電気泳動を行う。なお、試料溶液としてPQQを10体積%ピリジン水溶液に溶解させたのは、PQQが電荷を保ち続けるようにpHコントロールを行うためであり、10体積%ピリジン水溶液はこのpH調整能に優れる。

【0031】なお、電極間距離は5mm、印加電圧は300V（60V/cm）とし、濃縮時間は4分とした。

【0032】濃縮後、下記方法により、分析を行い、濃縮部のPQQモル量及び全試料溶液中のPQQモル量

( $15\mu\text{M} \times 40\mu\text{l}$ ) に対する割合を求め、結果を表1に示した。

#### 【0033】分析方法

シリコンチューブ1の陽極2側の端部から約5mm(チューブ全体の長さの10%の長さ)の位置1Aをクリップで挟み、濃縮部1Bの濃縮液をマイクロシリンジで吸い上げ(液量は $4\mu\text{l}$ )、液体クロマトグラフィー(溶離液:  $50\text{mM}$  ほう酸-ほう砂緩衝溶液( $\text{pH}7.4$ ))でPQQ濃縮を測定した。

#### 【0034】実施例1

陰極側電極3の移動を行ったこと以外は比較例1と同様\*

10

\*にして濃縮及び分析を行い、結果を表1に示した。

【0035】なお、電極の移動条件は下記の通りとした。

【0036】図1に示す電極位置(電極間距離5cm)において、 $300\text{V}$ で2分間濃縮を行った後、電極3を電極2側へ移動させ、電極間距離を3cmとし、 $300\text{V}$ で2分間濃縮を行った。(この場合、電位勾配は $60\text{V}/\text{cm}$ で2分間、 $100\text{V}/\text{cm}$ で2分間となっている。)

#### 【0037】

【表1】

例	電極の移動	濃縮部 $4\mu\text{l}$ 中のPQQモル量 ( $\text{pmol}$ )	全試料溶液中のPQQに対する濃縮部 $4\mu\text{l}$ 中のPQQの割合 (%)
比較例1	なし ( $60\text{V}/\text{cm}$ , 4分)	29.0	48.9
実施例1	あり ( $60\text{V}/\text{cm}$ , 2分+ $100\text{V}/\text{cm}$ +2分)	42.6	71.8

#### 【0038】II ピリドキサミン二塩酸塩の濃縮

##### 比較例2

試料溶液として下記のものを用い、比較例1と同様にして濃縮を行った。

#### 【0039】試料溶液

濃縮目的物質として上記PQQとは逆にプラスの電荷を持つピリドキサミン二塩酸塩(Pyridoxamine $\cdot 2\text{HCl}$ :  $\text{PX} \cdot \text{HCl}$ )を含む、 $19.5\mu\text{M}$ ピリドキサミン二塩酸塩-1体積%酢酸水溶液。PQQの濃縮ではPQQにマイナスの電荷を保ち続けさせるために10体積%ピリジン水溶液で $\text{pH}$ の調整を行ったが、ピリドキサミンは1体積%酢酸水溶液を用いることによりプラスの電荷を維持させた。ピリドキサミンはそのプラスの電荷のために陰極の方向へと電気泳動を行い濃縮される。 ※

30

※【0040】なお、印加電圧は $200\text{V}$ ( $40\text{V}/\text{cm}$ )とし、濃縮時間は4分とした。また、液体クロマトグラフィー分析の溶離液には $0.1\text{M}$ リン酸カリウム(リン酸により $\text{pH}3.2$ に調整):メタノール=98:2の液を用いた。

#### 【0041】実施例2

印加電圧 $200\text{V}$ ( $40\text{V}/\text{cm}$ )で2分濃縮を行った後、陽極側電極を移動させ、電極間距離を3cmとし、 $200\text{V}$ ( $67\text{V}/\text{cm}$ )で2分濃縮を行ったこと以外は、比較例1と同様にして濃縮及び分析を行い、結果を表2に示した。

#### 【0042】

【表2】

例	電極の移動	濃縮部 $4\mu\text{l}$ 中のPX $\cdot\text{HCl}$ モル量 ( $\text{pmol}$ )	全試料溶液中のPX $\cdot\text{HCl}$ に対する濃縮部 $4\mu\text{l}$ 中のPX $\cdot\text{HCl}$ の割合 (%)
比較例2	なし ( $40\text{V}/\text{cm}$ , 4分)	50.1	64.2
実施例2	あり ( $40\text{V}/\text{cm}$ , 2分+ $67\text{V}/\text{cm}$ , 2分)	71.3	91.4

【0043】表1, 2より明らかなように、本発明の方法によれば、目的物質を高濃度に濃縮することができる。

#### 【0044】

【発明の効果】以上詳述した通り、本発明の液体試料の★50

★濃縮方法によれば、電場濃縮法により試料溶液中の目的物質を著しく高濃度に濃縮することができ、従来法に比べて電場濃縮法の濃縮効率は大幅に改善される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施に好適な濃縮装置の一実施例を示

す断面図である。

【図2】本発明の実施に好適な濃縮装置の他の実施例を示す断面図である。

【符号の説明】

1 シリコンチューブ

\* 2, 3 電極

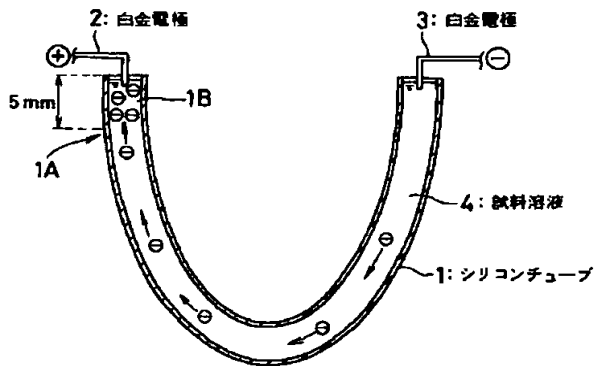
4 試料溶液

6 固定電極

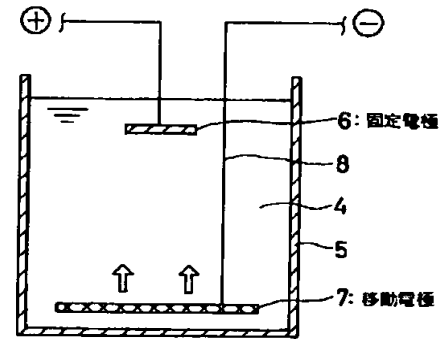
7 移動電極

\*

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// C 1 2 N 13/00